

未利用セルロース系バイオマスからの 有用性ケミカルの生産

佐々木千鶴*

Production of useful chemicals from un-utilized cellulosic materials

by
Chizuru SASAKI

To produce D-lactic acid and ϵ -Poly-L-lysine from glucose derived from sugar cane bagasse, the production of fermentable sugars from un-utilized sugarcane bagasse was studied by hydrothermal method, steam explosion and further saccharification of the pretreated solid residues. The maximum values, i.e. 76% and 97%, of glucose in the polysaccharide of steam-exploded material and water extracted residue after steam-explosion were obtained at 20 atm steaming pressure, respectively. The high yields of D-lactic acid, i.e. 81% and 87%, were attained from glucose derived from extracted residue with water after steam-explosion and extracted residue with water and alcohol after steam explosion, respectively. In the case of production of ϵ -Poly-L-lysine, 4.4% of ϵ -Poly-L-lysine in the total amount of glucose was achieved using steam-exploded bagasse hydrolysate treated with ion-exchange resin as carbon sources.

Key words: steam explosion, enzymatic saccharification, D-lactic acid, ϵ -Poly-L-lysine

1. まえがき

近い将来訪れる化石資源の枯渇や二酸化炭素量増加などによる環境汚染問題の懸念から、化石資源依存社会から再生産可能資源であるバイオマスを利用した循環型社会への移行が望まれている^[1]。そこで現在盛んにエネルギー生産の研究として行われているのが、食糧との競合がない未利用のセルロース系バイオマスからのエタノール生産

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門

*連絡先：〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

である。廃材や建設発生木材などから主要成分であるセルロースを効率的に取り出し、単糖であるグルコースに加水分解し、これを炭素源として微生物を培養することでエタノールを得る。ここで、糖質原料やデンプン質原料とは異なるセルロース系バイオマスを原料としたエタノール生産過程において大変重要となるのが、前処理と呼ばれる脱リグニン処理である。現在、この前処理は、粉碎や電子線照射などの①物理的処理、酸やアルカリや有機溶媒を混合して処理する②化学的処理、高温高压条件下で水と熱を用いる③物理化学的処理さらには木材腐朽菌などの微生物

の働きを利用する④生物的处理の4種類に分類されている^{[2],[3]}。現在主として用いられているのは薬品を用いて処理される②の化学的处理である。しかし、薬品使用による環境負荷への懸念、耐薬品施設を要する、酸・アルカリの中和、有機溶媒の廃棄のためのコストなど多くの課題を抱えており、低エネルギーかつ環境低負荷な新規前処理法の開発が望まれている。

未利用のセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産のプロセス、すなわち、「セルロース系バイオマス→セルロース→グルコース→微生物変換→有用性物質」を利用することにより、エタノール以外の高付加価値な有用性ケミカルの生産も可能である。しかし、我が国における未利用のセルロース系バイオマスからの有用性ケミカルの生産に関する研究報告例はまだ少ない。そこで、我々は今後期待される有用性ケミカルの一つであるポリ乳酸の原料であるL-乳酸の光学異性体であるD-乳酸および天然の食品添加物として広く汎用されている機能性ポリマーであるε-ポリリジンの未利用セルロース系バイオマスからの生産に着目した。D-乳酸は、L体のみからなるポリ乳酸とD体のみからなるポリ乳酸とでステレオコンプレックスを形成させることで耐熱性が約50℃増大する^{[4],[5]}との新たな知見がありながら、未だ未利用資源からの効率的生産法はほとんど研究されていない。また、ε-ポリリジンも同様に今後石油由来原料の代替原料として期待されているが、未利用資源からの生産法は検討されていない。さらにこれらの有用性ケミカルの市場価格は、D-乳酸で3万円/100mg^[6]、ε-ポリリジンで5万円/kgと高価であり、これらの生産をエタノールと併せて行うことで利益を創出しながら有用性ケミカルを生産するプロセスを構築することができる。これにより、前処理やセルロースの酵素による分解処理、発酵過程にかかるコストをプロセス内で得られた利益で賄うことが可能となる。

そこで本研究では、未利用のセルロース系バイオマスとして沖縄県と鹿児島県を中心にして生産されているサトウキビの砂糖抽出後の滓(バガス)を用いて、上記前処理に示した③の物理化学的处理に分類される、水と熱のみによる処理が可能な水蒸気爆砕処理を用いてその前処理効果を検討した。その後、水蒸気爆砕処理したバガス由来の糖(グルコース)を酵素糖化により得たのち、これを炭素源として、乳酸菌および放線菌を培養し、D-乳酸およびε-ポリリジンのそれぞれを発酵生産させた。

2. 実験

2-1. 試料

サトウキビの絞り滓であるバガスを裁断したもの(1mm幅×5cm長、球陽製糖(株)、沖縄より供与)を供試した。

2-2. バガスの前処理

バガスの前処理には水蒸気爆砕処理(日本化学機械製造(株))を用いた。水蒸気爆砕処理では、バガス150gを反応器に入れ、内部の空気を水蒸気に置換した後、所定圧力の飽和水蒸気を反応器内に導入し、所定時間蒸煮後、瞬時に大気圧まで減圧し、水蒸気爆砕処理バガスを得た。処理に用いた水蒸気圧力は10, 15, 20, 25, 30および35 atmとし、蒸煮時間は5分とした。

2-3. 成分分析

水蒸気爆砕処理したバガスは水とアルコールによる抽出操作を用いて成分分析を行った(Fig. 1)。バガスの粉末、水蒸気爆砕処理後のバガスをそれぞれ乾燥重量で2.0gとり、100 mlの蒸留水で室温下にて24時間抽出した。その後、ろ過により残渣とろ液に分離し、ろ液は水可溶性成分とし、硫酸により加水分解し、フェノール硫酸法を用いて全糖を定量した。得られたグルコース量をセルロース量に換算し、全体からこれを差し引いたものをヘミセルロース量とした。また、低分子量リグニンは水可溶性成分から全糖を差し引き求めた。一方、残渣はさらにアルコールで抽出し、残渣はアルコール不溶性成分とし、硫酸加水分解により生成したグルコース量をセルロース量として換算した。硫酸加水分解処理により残渣として残ったものを

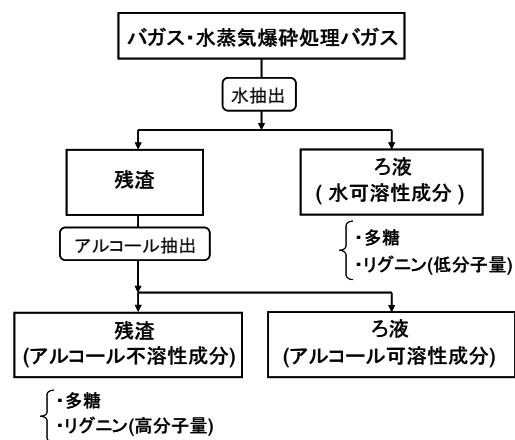


Fig. 1 Composition analysis of bagasse and steam-exploded bagasse

高分子量リグニンとした。また、ろ液はアルコール可溶性成分とした。

2-4. 酵素による糖化およびその評価

試料(乾燥重量 0.3 g)を秤量し、0.05 M 酢酸緩衝液(pH 5.0、10 ml)を加え、メイセラゼ(明治製菓(株))を基質量の 1/10 になるように添加し、50℃、140 rpm にて振盪し酵素糖化した。所定の時間(48 時間)反応終了後、ろ過により糖化残渣とろ液とに分別した。ろ液は、90℃の熱水に 10 分間保持し、酵素を失活させた後、グルコース量の定量に供試した。グルコース量はグルコースオキシターゼを用いる酵素法を用いて定量した。

2-5. D-乳酸の発酵生産およびその分析

乳酸発酵菌には、D 体を選択的に生産することのできるホモ乳酸発酵菌である *Lactobacillus delbrueckii* NBRC 3534^[7]を用いた。前培養培地には、炭素源 5 g/L、ポリペプトン 5 g/L、酵母エキス 5 g/L および硫酸マグネシウム七水和物 1 g/L を混合して用いた。本培養用の培地は、グルコースを除いたその他の栄養源およびバガス由来の炭素源を混合して用いた。バガス由来の炭素源は、水蒸気爆砕処理したバガス、水蒸気爆砕後上記 2-2 にて示した水抽出残渣およびアルコール不溶性成分の計 3 種類をそれぞれ酵素糖化により加水分解し、グルコースとした後用いた。任意の時間間隔でおよそ 1 ml の培養液を採取し、グルコース濃度および D-乳酸濃度を測定した。グルコースはグルコースオキシターゼ法、D-乳酸濃度は高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。分析温度は 65℃、溶離液および溶出速度はそれぞれ 5.0 mM の硫酸水溶液、0.6 ml/min とし、カラムは Aminex HPX-87H (Bio-Rad) を用いた。

2-6. バガス由来炭素源を用いた ε-ポリリジンの発酵生産およびその分析

ε-ポリリジン発酵生産菌には、放線菌である *Streptomyces albulus* 11011A (チッソ(株)より供与)を用いた。前培養培地には、グルコース 50 g/L、硫酸アンモニウム 10 g/L、酵母エキス 5.0 g/L、リン酸水素二ナトリウム 1.4 g/L、リン酸二水素ナトリウム 0.8 g/L、さらに硫酸マグネシウム七水和物、硫酸亜鉛七水和物、硫酸鉄七水和物をそれぞれ 0.5 g/L、0.04 g/L、0.03 g/L を混合し

て用い、500 ml の坂口フラスコに上記を混合した培地を 100 ml 調製 (pH 6.3) し、*Streptomyces albulus* 11011A を一白金耳植菌し、30℃にて 24 時間培養したものを前培養液とした。バガス由来の炭素源は、水蒸気爆砕処理したバガスを酵素糖化により加水分解したのち、陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂により精製したのち、凍結乾燥により濃縮したものをグルコース濃度 50 g/L となるようにその他の培地成分(上記からグルコースを除いたもの)と混合して用いた。調製した培地を 1L の培養槽 (Bioneer series 100-1L, 丸菱バイオエンジニアリング(株))に 500 ml 入れ、前培養液を添加し、連続的に通気(1.0 vvm)および攪拌(500~700 rpm)を行い培養した。さらに培養中は、培地 pH の低下を防ぐために 10%アンモニア水を適宜添加し、炭素源と窒素源の枯渇を防ぐためにグルコースを 50%と硫酸アンモニウムを 5%溶解したフィード液を適宜添加した。任意の時間間隔でおよそ 1 ml の培養液を採取し、グルコース濃度およびε-ポリリジン濃度を測定した。グルコースはグルコースオキシターゼ法、ε-ポリリジンはメチルオレンジ法^[8]を用いて定量した。

3. 結果と考察

3-1. バガスの有効前処理法の検討

バガスを水蒸気圧力 10 atm(180℃)、15 atm(198℃)、20 atm(212℃)、25 atm(224℃)、30 atm(234℃)、35 atm(243℃)のそれぞれの高温高圧下で 5 分間蒸煮した後、一気に常圧に戻し、水蒸気爆砕処理を行った。その後、得られた処理物の酵素糖化を行った (Fig. 2, (A))。反応後 48 時間において、最大のグルコース収量を示したものは、水蒸気圧力 20 atm で処理したものであり、バガスの水蒸気爆砕処理物 (乾燥重量) 1 g あたり、364 mg のグルコースが得られた。これは多糖あたり 76%の収率に相当した。さらに、それぞれの水蒸気爆砕処理バガスを水抽出し、残渣を用いて酵素糖化を行ったところ、グルコースの収量は増大し、水蒸気圧力 20 atm では 469 mg / 1 g-爆砕処理バガス(乾燥重量)を示した (Fig. 2, (B))。多糖あたりのグルコース収率は 97%となった。また、それぞれの水蒸気圧力で処理したのものについても得られるグルコース量は増大した。これは、水蒸気爆砕処理した試料を水で洗浄することにより、酵素の働きを阻害する物質が除去され、酵素が基質(セルロース)と反応しやすくなったためと考えられる^{[9], [10]}。次にそれぞれの水蒸気圧力にて処理したバガ

ス中の成分を比較 (Table 1) したところ、水蒸気圧力 20 atm で処理したバガスの水アルコール不溶成分、すなわちパルプ部分の高分子量リグニンの水蒸気爆砕処理物全体に対する含有率は 19.5%であり、処理していないバガス (高分子量リグニンは全体の 24%)と比較すると、バガス中の 19%の高分子量リグニンが低分子化され水あるいはアルコールに可溶になったことがわかった^[11]。また、パルプ部分の多糖は全体の 48%であり、これによりバガス中の 66%の多糖が残存していることが確認できた。一方、水蒸気爆砕処理圧力を 20 atm から増大させると、パルプ部分の多糖が減少するだけでなく、高分子量リグニンの割

合が増大した。これは、高温高压の条件下による高分子量リグニンのホロセルロースや低分子量リグニンとの重合あるいは自己の再重合に起因しているものと考えられる^{[12], [13]}。これらの結果から、バガスへの最適水蒸気爆砕処理圧力は 20 atm とし、以下の実験に用いた。

3-2. バガス由来グルコースからの D-乳酸の発酵生産試験

バガス由来グルコースを培地中の炭素源として用いることによる D-乳酸の発酵生産を検討した。培地に用いる炭素源を、水蒸気爆砕したバガス、水蒸気爆砕後水で洗浄

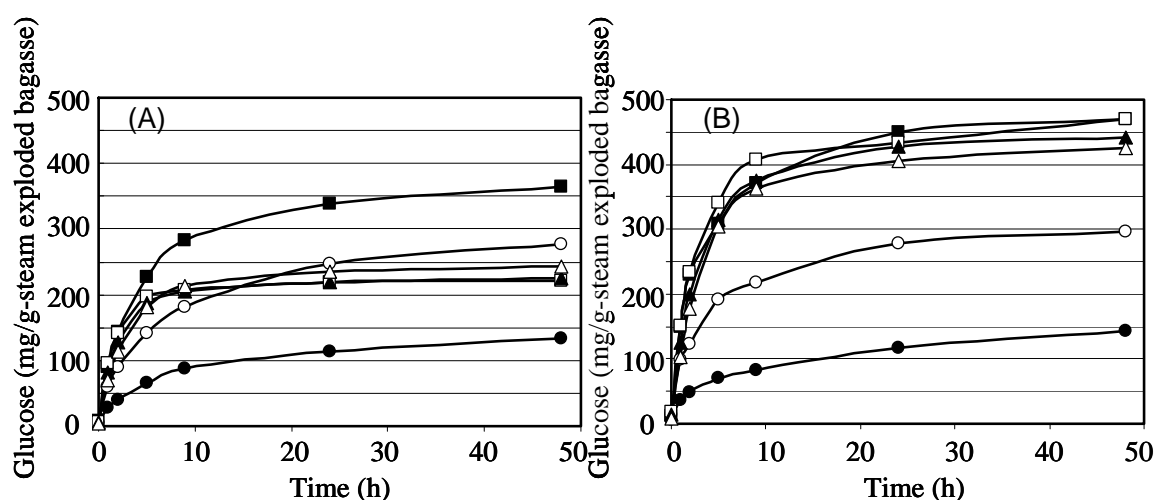


Fig. 2 Enzymatic saccharification of steam exploded (steaming time 5 min) bagasse (A) and water extracted residue after steam-explosion (B). Symbols (●) steaming pressure 10 atm; (○) 15 atm; (■) 20 atm; (□) 25 atm; (▲) 30 atm; (△) 35 atm.

Table 1 Chemical composition analysis of bagasse and steam-exploded bagasse at different conditions

	Grinded bagasse	10 atm (180°C)	15 atm (198°C)	20 atm (212°C)	25 atm (224°C)	30 atm (234°C)	35 atm (243°C)
Water soluble material	1.9	9.6	18.6	19.6	11.2	9.7	10.1
Polysaccharide	0.8	7.7	17.5	17.5	6.0	4.6	3.9
Cellulose	0.1	1.3	0.8	1.3	1.3	1.9	1.6
Hemicellulose	0.7	6.4	16.7	16.2	4.7	2.7	2.3
Lignin (Low-molecular lignin)	1.1	1.9	1.1	2.1	5.2	5.1	6.2
Alcohol soluble material	1.6	3.3	7.8	13.4	22.7	23.8	22.7
Water-alcohol insoluble material (Pulp)	97.1	86.2	73.7	67.5	65.9	67.0	67.2
Polysaccharide	73.0	62.1	52.0	48.0	44.5	41.7	37.1
Cellulose	35.2	34.0	38.0	42.2	41.9	40.6	36.1
Hemicellulose	37.7	28.1	14.0	5.8	2.6	1.1	1.0
Lignin (High-molecular lignin)	24.1	24.1	21.7	19.5	21.4	24.9	30.1
計	100.6	99.1	100.1	100.5	99.8	100.5	100.0

した残渣、水蒸気爆砕後水およびアルコールで洗浄した残渣(アルコール不溶性成分)の3種類をそれぞれ酵素により糖化しグルコースとし、所定の濃度に調整し使用した。また、比較として市販グルコースを用いた基礎培地によるD-乳酸の発酵生産を行った。Fig. 3に *Lactobacillus delbrueckii* NBRC 3534 を用いた D-乳酸の発酵生産におけるグルコースの消費 (a)および D-乳酸の生産(b)挙動を示す。市販グルコースを用いた場合の基礎培地と水蒸気爆砕処理バガスを水で洗浄した残渣、水とアルコールで洗浄

した残渣の場合、24 時間の培養時間においてグルコースはいずれもほぼ完全に消費され、D-乳酸の生産量はそれぞれ、4.9、4.1、4.3 g/L 得られた。しかし、水蒸気爆砕処理後洗浄操作をしなかったバガス残渣の糖化液を用いた場合には、グルコースの消費はほとんどなく、D-乳酸の生産も 0.5 g/L しか見られなかった。これは、培地中にバガスの水蒸気爆砕処理によって産生された低分子量リグニンやヘミセルロース由来の分解物を含む^{[14],[15]}ため、これらにより発酵が阻害されたと考えられる。よって、水

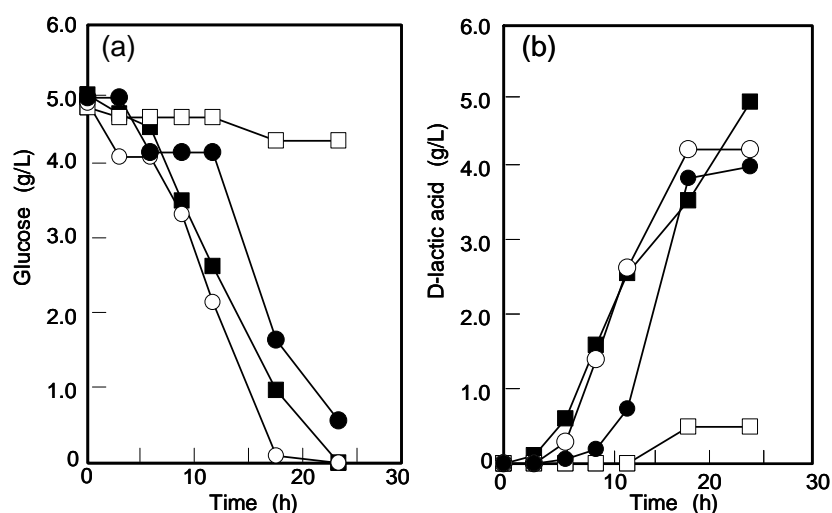


Fig. 3 Profiles of glucose consumption (a) and D-lactic acid production (b) using *Lactobacillus delbrueckii* NBRC 3534. Symbols (■) Basal medium; (□) Steam-exploded bagasse; (●) Water extracted residue after steam-explosion; (○) Water-alcohol extracted residue after steam-explosion.

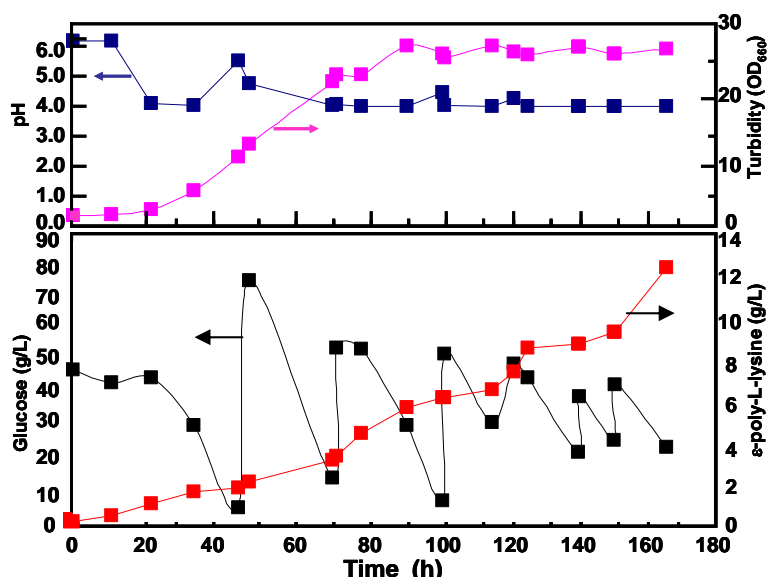


Fig. 4 Production of ϵ -poly-L-lysine using glucose derived from steam exploded bagasse as carbon source by *Streptomyces albulus* 11011A

やアルコールによる水蒸気爆砕処理物の洗浄は、先の 2-3 に示した成分の分離のための単なる手段ではなく、バガスに含まれるリグニンやヘミセルロース由来の発酵阻害物質を取り除くための簡便な操作となりうるということが明らかとなった。

3-3. バガス由来グルコースからのε-ポリリジンの発酵試験

バガス由来グルコースを培地中の炭素源として用いることによるε-ポリリジンの発酵生産について検討した。

Fig. 4 に *Streptomyces albulus* 11011A を用いてε-ポリリジンを発酵生産した結果を示す。放線菌の増殖とともに培地中の pH が 6.3 から下がり始め、同時にε-ポリリジンの生産が開始された。また、グルコースの減少にともない、およそ 20 時間おきにグルコースを添加した。ε-ポリリジンの生産は培養時間 160 時間で最大値 12.7 g/L を示し、グルコースの総添加量 286 g に対して収率 4.4 % が得られた。平木ら^[16]による化学合成培地を用いたε-ポリリジンの発酵生産結果によると収率は 8.0% であるので、今後は培養条件をさらに詳細にコントロールし、収率の増大を図る。

4. まとめ

(1) バガスの前処理として物理化学的前処理である水蒸気爆砕処理(蒸気圧力 20 atm、蒸気時間 5 分)により、高効率(多糖当たり 76%)でグルコースを得ることができた。また、水蒸気爆砕処理を行った後、水で洗浄することによりさらにグルコースの収率(多糖当たり 97%)が増大することがわかった。

(2) バガス由来のグルコースを炭素源として

Lactobacillus delbrueckii NBRC 3534 を用いて D-乳酸の発酵生産試験を行ったところ、水蒸気爆砕処理したバガスを水、水とアルコールでそれぞれ洗浄した残渣を酵素糖化したものを用いた場合、グルコースの D-乳酸への変換率はそれぞれ 81、87% と高い値が得られた。これは、洗浄により、バガスの水蒸気爆砕処理の際に産生されたリグニンやヘミセルロース由来の分解物である発酵阻害物質が除去されたためであると考えられる。

(3) バガス由来のグルコースを炭素源として放線菌

Streptomyces albulus 11011A を用いてε-ポリリジンの発酵生産を行ったところ、添加グルコース当たり 4.4% の収率で得られた。

5. 謝辞

本研究は、徳島大学平成 21 年度先端工学教育プロジェクト研究助成金の援助を受けて遂行した。

6. 参考文献

- [1] 小宮山宏ら, バイオマス・ニッポンー日本再生に向けて, 日刊工業新聞社, 2003
- [2] 越島哲夫編, セルロース資源ー高度利用のための技術開発とその基礎, 学会出版センター, pp.79-139, 1991
- [3] 東順一, 越島哲夫, 酵素系による木材多糖の加水分解, 木材研究・資料, 17, pp. 1-20, 1983
- [4] Tsuji H., Ikada Y., Hyon S., Kimura Y., Kitao T. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid). VIII. Complex fibers spun from mixed solution of poly(D-lactic acid) and poly(L-lactic acid). *J. Appl. Polym. Sci.* 51, pp.337-344, 1994
- [5] Tsuji H., Fukui I. Enhanced thermal stability of poly(lactide)s in the melt by enantiomeric polymer blending. *Polymer* 44(10), pp.2891-2896, 2003
- [6] ナカライテスク総合カタログ pp.463
- [7] Fukushima K., Sogo K., Miura S., Kimura Y., Production of D-Lactic Acid by Bacterial Fermentation of Rice Starch. *Macromol. Biosci.* 4, 1021-1027, 2004
- [8] Itzhaki R.F., Colorimetric Method for Estimating Polylysine and Polyarginine. *Anal. Biochem.*, 50, pp.569, 1972
- [9] Xuejun P., Role of Functional Groups in Lignin Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose, *J. Biobased Mater. Bio.*, 2, pp. 25-32, 2008
- [10] Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M., Inhibition of cellulase by phenols, *Enzym. Microb. Tech.*, 46, pp. 170-176, 2010
- [11] Nakamura Y., Sawada T., and Inoue E., Enhanced ethanol production from enzymatically treated steam-exploded rice straw using extractive fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, pp.879-884, 2001
- [12] 沢田達郎, 中村嘉利, 折笠仁志, 大永誠, 井上英一, 稲わらの前処理と構成成分の有用資源化, 環境科学会誌 10(4), pp.313-322, 1997
- [13] Kobayashi F., Take H. Asada C., and Nakamura Y.,

Methane Production from Steam-exploded Bamboo. *J.*,

Biosci. Bioeng., 97(6), pp.426-428, 2004

[14] Dunlop, A. P., Furfural formation and behavior. *Ind. Eng.*

Chem. 40(2), 204-209, 1948

[15] Bardet, M., Robert, D. R., Lundqvist, K., On the reactions

and degradation of the lignin during steam hydrolysis of

aspen wood. *Sven. Papperstidn*, 6, 61-67, 1985

[16] Hiraki J., Hatakeyama M., Morita H., Izumi Y., Improved

Production of an *S*-(2-Aminoethyl)-L-Cysteine Resistant

Mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsu-kogaku*, 76(12),

pp. 487-493, 1998